

# カラマツ木部柔細胞の深過冷却能に関与する冬季誘導性蛋白質の解析

バイオマス転換学講座 資源植物創成学分野

森本 和成

**【背景】**寒冷地に生育する樹木は冬季に厳しい氷点下温度にさらされる。樹木構成細胞は組織によって凍結挙動が異なり、樹木の師部柔細胞や形成層細胞は細胞外凍結によって、木部柔細胞は深過冷却によって氷点下温度に適応している。細胞内水分を液体状態で保ったまま氷点下温度に適応する深過冷却能には物理的な限界温度があるため、北方樹木木部柔細胞は細胞外凍結をする組織に比べて凍結抵抗性が低い。そのため、木部柔細胞の過冷却限界温度は樹木の寒冷地への分布限界を決める重要な要因のひとつである。本研究の供試木であるカラマツの木部柔細胞の過冷却能力は夏季には $-20^{\circ}\text{C}$ 付近であるが、冬季には $-60^{\circ}\text{C}$ 程度にまで達する。このように季節的低温馴化によって凍結抵抗性が顕著に誘導されるカラマツ木部柔細胞の深過冷却機構を総合的に理解するために、これまでに当研究室では低温応答性遺伝子群や糖組成の解析、過冷却促進成分の探索などを行ってきた。しかし、主たる細胞成分の一つである可溶性蛋白質が深過冷却機構に果たす役割に関する知見は少ない。そこで、本研究ではカラマツ木部柔細胞の深過冷却に関与する可能性のある冬季誘導性蛋白質群を特定し、それらを同定ならびに機能評価することで深過冷却機構を解明することを目的として研究を行った。

**【材料及び方法】**供試材料として北海道大学構内の苗畑に生育するカラマツ(*Larix kaempferi*)の2~5年生の枝を用いた。脱馴化処理は、冬季(2月)に採取した枝を乾燥を防ぎながら $23^{\circ}\text{C}$ の暗条件下で一週間静置することで人為的に行った。木部柔細胞の凍結抵抗性(過冷却能力)は電解質漏出法で測定した。可溶性蛋白質の抽出は木部組織を抽出バッファー中でポリトロンを用いて破碎した後、この濾液を高速遠心ならびに超遠心にかけて、上清を回収することで行った。この上清画分を木部に蓄積する可溶性蛋白質画分(可溶性画分)とみなした。蛋白質組成の分析は一次元目に等電点電気泳動法、二次元目にSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動法により行った。候補蛋白質の同定は、二次元電気泳動後のゲルから目的とする蛋白質スポットを切り出して溶出させた後、アミノ酸シーケンサー分析及びLC-MALDI MS/MS解析による de novo sequencing を行い、その分析結果をもとにデータベースによる相同性検索によって行った。

**【結果と考察】**夏季(7月)に採取した枝の木部柔細胞の過冷却能力は約 $-20^{\circ}\text{C}$ であったが、冬季(2月の厳寒期)に採取した枝では木部柔細胞の過冷却能力は $-50^{\circ}\text{C}$ 以下となり、季節的低温馴化によって木部柔細胞の過冷却能力は大きく上昇した。また、厳寒期の枝を人為的に脱馴化処理すると、脱馴化7日目まで約 $-34^{\circ}\text{C}$ まで過冷却能力は低下した。次に、季節的な過冷却能力の上昇ならびに脱馴化処理による過冷却能力の低下に応答して変動する蛋白質を特定するため、過冷却能力が最も高い冬季と脱馴化処理によって最も過冷却能力が低下した脱馴化7日目、過冷却能力が最も低い夏季の3つの時期に採取した試料から調製した可溶性蛋白質画分を二次元電気泳動法で分離し、蛋白質スポットの染色パターンを比較した。その結果、過冷却能力の変動とよく対応した16個の可溶性蛋白質スポットを見出した。そこで、これら蛋白質を単離してアミノ酸配列の分析により蛋白質の同定を試みたところ、16個すべての蛋白質について部分的なアミノ酸配列を予測できた。その中には樹木由来の機能未知な蛋白質やLEA(Late Embryogenesis Abundant)蛋白質と相同性を示すものがいくつか見出された。